

A téma címe: **A foszforilációs-defoszforilációs jelátviteli útvonalak kölcsönhatásai a szabad gyökök által kiváltott jelátviteli pályákkal (T037210)**

Témavezető neve: **Dr. Gergely Pál**

A kutatás időtartama: **2002-2005**

Zárójelentés

A kutatási pályázatban vázolt valamennyi területen sikerült eredményeket elérnünk és 15 angol nyelvű közleményben (összesített IF közel 50), valamint számos nemzetközi és hazai kongresszus előadásain és poszterein számoltunk be ezekről. A zárójelentésben csak a megjelent közleményeket adjuk meg és dőlt betűvel hivatkozunk az ott részletesen bemutatott eredményekre. A közleményeket a megjelenés sorrendjében jelöltük.

I. Az oxidatív stressz által aktivált poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) szabályozása

Az OTKA pályázat alapvető célkitűzéseként megjelölt területet összefoglaló munkában ismertettük, amelyben a nitrogén-monoxid termelődésével kapcsolatos oxidatív stressz által kiváltott jelátvitel szerepét tárgyaltuk. Az oxidatív és nitrozatív stressz hatásainak általános áttekintése mellett elsősorban a bőrben tapasztalható hatásokra fókuszáltunk. A munkából kiderül, hogy míg az NO bőrben betöltött szerepét számos tanulmányban vizsgálták, az NO-ból keletkező és az NO citotoxikus hatásaiért felelős reaktív intermedierek (pl. a peroxinitrit) képződésének lehetőségét érdemben még nem tanulmányozták. Új kutatási területnek tekinthető az oxidatív stressz által kiváltott poli-ADP-riboziláció, mint a DNS károsodása által kiváltott jelátviteli mechanizmus vizsgálata is. Az irodalmi adatok és saját eredményeink alapján valószínűsíthető a nitrogén-monoxid – peroxinitrit – poli-ADP-ribozilációs útvonal aktivációja különböző, elsősorban gyulladásos bőrbetegségekben (3).

Az oxidatív stressz által stimulált jelátvitel egyik legismertebb komponense a kalcium mobilizáció. Korábbi munkánkban igazoltuk, hogy a peroxinitrit is képes kalciumot mobilizálni timocitákban. Ennek nyomán a DEOEC Élettani Intézetével kialakított kollaborációban most HaCaT humán keratinocita sejtvonalban is megvizsgáltuk a kalcium mobilizáció és a peroxinitrit által kiváltott sejthalál kapcsolatát. Megállapítottuk, hogy a peroxinitrit HaCaT sejtekben is intracelluláris kalcium mobilizációt okoz, és ennek forrása nagyobb részben az extracelluláris tér, kisebb részben az intracelluláris raktárak. Igazoltuk a kalcium mobilizáció szerepét mind az apoptotikus, mind a nekrotikus sejthalálban. Azonosítottunk továbbá egy új, a sejtek oxidatív stresszérzékenységét meghatározó tényezőt, a sejtdenzitást (4).

Ebben az összefoglaló munkában elemeztük a reaktív nitrogén intermedierek (RNI) citotoxicitásának mechanizmusát. Bemutatjuk, hogy míg az RNI alapmolekulájának tekinthető nitrogén monoxid főleg fiziológiás szabályozó funkciókkal bír, addig a szuperoxid gyökkel való reakciójában keletkező peroxinitrit - erőteljes oxidatív és nitráló képessége révén - citotoxikus hatású. A peroxinitrit sejtkárosító hatásai részben a makromolekulák közvetlen módosítására (fehérje oxidáció és nitrálás, lipid peroxidáció, DNS bázisainak módosítása, a DNS láncok törése), részben viszont egy - a DNS törések által stimulált - szekunder válaszreakcióra, a poli-ADP-ribóz anyagcsere fokozódására vezethető vissza. Tárgyaltuk a fokozott poli-ADP-ribóz anyagcsere szintetikus és a nemrégiben vizsgálni kezdett katabolikus tényezőinek szerepét a peroxinitrit és általában az oxidatív stressz szövetkárosító hatásaiban (6).

Az intenzív oxidatív stressz citotoxikus hatását vizsgáltuk HaCaT keratinocita sejtvonalon. Munkánk előzményeként kimutattuk, hogy a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) gátlása védelmet nyújt az oxidatív stressz citotoxikus hatásával szemben HaCaT sejteken is (Szabó E. és mtsai *J. Invest. Dermatol.* 117(1):74-80, 2001). Ennek folytatásaként a poli(ADP-ribóz) anyagcsere katabolikus enzimjének, a poli(ADP-ribóz) glikohidroláznak (PARG) a szerepe is felmerült e folyamat szabályozásában. Az ismert PARG gátló hatású gallotannin jelentős védelmet biztosított a HaCaT sejtek hidrogén-peroxiddal és peroxinitrittel kiváltott sejthalállal szemben. Gallotanninnal előkezelt sejtekben az oxidatív stresszágensek kisebb fokú NAD^+ szint csökkenést, apoptózist (kaszpáz aktiváció) és nekrotikus sejthalált (propidium-jodid felvétel, LDH kiszabadulás) és csökkent PARP aktivációt váltottak ki. Ugyanakkor megfigyelhető volt a PAR polimer akkumulációja a gallotanninnal kezelt sejtekben. Ennek alapján úgy gondoljuk, hogy a gallotannin citoprotektív hatásának egyik mechanizmusa a PARG gátlás következtében fokozódó PARP auto-poli(ADP-ribozil)áció és következményes PARP gátlás lehet, de a gallotannin antioxidáns és közvetlen PARP gátló hatása is szerepet játszhat a citoprotektív effektusban (7).

Megvizsgáltuk a poli(ADP-ribozil)áció szerepét asthmában, egy oxidatív stresszel jellemzett gyulladásos betegségmodellben. Bár a PARP gátlószerek gyulladásgátló hatásait különböző klasszikus (Th_1 -mediált) gyulladásmodellben sokrétűen igazolták, a lényegesen eltérő mechanizmusú, Th_2 sejtek által irányított allergiás típusú gyulladásban a PARP szerepe nem volt ismert. Ovalbumin szenzitizálást követően ovalbumin inhalációval váltottunk ki asthmát egerekben, és a PJ-34 jelű PARP gátlószer hatásait vizsgálva következtettünk a poli(ADP-ribozil)áció asthmában betöltött szerepére. Azt tapasztaltuk, hogy az enyhébb, csupán egyszeri ovalbumin inhalációval stimulált modellben a PJ-34 gátolta a granulociták vándorlását a bronchoalveoláris mosófolyadékba, bár a többszöri ovalbumin inhalációs protokollban ilyen védő hatása már nem volt tapasztalható. Az enyhébb modellben folytatva a vizsgálatokat megállapítottuk, hogy PARP gátlás hatására a citokin/kemokin mintázat megváltozik, és számos, a granulocita migráció szempontjából fontos kemokin/citokin termelődése csökkent. Valószínűleg a PARP gátlásnak a gyulladásos mediátorok termelődésében játszott szerepe lehet felelős az antiasthmátikus effektusért is (8).

A PARP gátlószerek legmarkánsabb *in vivo* hatása a granulociták migrációjának a gátlása. Ez részben az adhézis molekulák expressziójának csökkenése révén valósul meg. A jelenség hátterében vizsgáltuk egy másik mechanizmus, a kemokinek expressziójának változását tüdő epithel sejtekben alacsony denzitású array-vel és RT-PCR-rel. Míg a PARP gátló PJ-34 jelentősen nem befolyásolta a citokinekkel stimulált kemokinexpressziót, a PARG gátló hatásáról is ismert gallotannin jelentősen csökkentette azt. A jelenség hátterében az NF κ B, az AP-1 és a CREB transzkripciós faktorok aktiválódását vizsgáltuk. Míg a gallotannin az aktivációt mindhárom esetben gátolta a PJ34 csupán az NF κ B aktivációt blokkolta. Vizsgáltuk a három útvonal proximális eseményeit is (IkB foszforiláció, NF κ B transzlokáció, MAP kinázok aktivációja) melyeket a gallotannin jelentősen modulált, míg a PJ34 nem befolyásolt. A gallotannin antioxidáns és PARG gátló hatásait is meghatároztuk. Míg az antioxidáns hatás alacsony koncentrációk mellett (<30 μM) is jelentős volt, a PARG gátlása csak a transzkripciós és jelátviteli kísérletekben alkalmazottnál nagyobb koncentrációknál volt megfigyelhető. Mindezek alapján úgy tűnik, hogy A549 sejtben a kemokinexpresszió lényegében nem áll poli(ADP-ribozil)ációs szabályozás alatt, és a gallotannin hatásai is függetlenek a poli(ADP-ribozil)ációtól. Ezért a PARG szerepének vizsgálatára specifikusabb módszerekre (pl. iRNS) van szükség, aminek tesztelése laboratóriumunkban folyamatban van (13).

II. Oxidatív stressz hatásai a porcdifferenciációt szabályozó jelátviteli útvonalakban szerepet játszó fehérjék foszforiláltsági állapotára

Kísérleteink során csirkeembriók végtagtelepeiből izolált mezenchimális sejtekből létrehozott porcosodó high-density kultúrákban (HDK) tanulmányoztuk az *in vitro* porcdifferenciáció szabályozásában szerepet játszó Ser/Thr-specifikus protein foszforilációs folyamatokat. Vizsgáltuk a különböző protein kinázok (PKA: cAMP-függő protein kináz, PKC: Protein kináz C, PKG: cGMP-függő protein kináz és PKD: protein kináz D), valamint a protein foszfatáz-1 és 2A (PP1 és PP2A) aktivitásának, illetve expressziójának változásait a porcdifferenciáció előrehaladtával. A tenyésztő médiumhoz protein kináz, illetve foszfatáz inhibitorokat adva gátoltuk az említett enzimek aktivitását és elemeztük az enzimaktivitások változásainak a porcdifferenciációra gyakorolt hatását. A porcképződés mértékének megítélésére a porcmátrixban nagy mennyiségben jelen levő proteoglikánokat metakromáziásan megfestő dimetil-metilénkék festést követő kvantitatív számítógépes képanalízist, valamint az I. és II. típusú kollagének immunoblottal történő kimutatását használtuk (1). A porcdifferenciációval párhuzamosan mind a PKA, mind a PP2A aktivitása csökkent, míg a PP1 aktivitás magas, de változatlan szinten maradt. Ha okadainsav (OA) adásával gátoltuk a PP2A aktivitását, jelentősen fokozódott a porcképződés, valamint az OA adását követően szignifikánsan emelkedett a PKA aktivitása is. Amikor H89-cel gátoltuk a PKA aktivitását, a porcképződés szinte teljesen elmaradt, de az OA adását követően ebben az esetben is erőteljesebb porcképződést tapasztaltunk. A PKA katalitikus alegységének expressziója nem változott szignifikánsan egyik kísérleti csoportban sem és a porcdifferenciáció előrehaladásával sem csökkent a fehérje kifejeződése. OA adását követően fokozódott, míg H89-kezelés után csökkent a cAMP Response Element Binding fehérje (CREB) foszforilációja a kultúrák sejtjeiben. Eredményeink arra utalnak, hogy a PP2A szerepet játszik a PKA jelátviteli út szabályozásában a porcdifferenciáció során (1).

Az ízületek gyulladásos megbetegedései során jelentős mértékű oxidatív stressz éri az ízületeket felépítő szöveteket. Vizsgáltuk, hogy csirke embriók végtagtelepeiből izolált porcosodó mezenchimális sejtekből előállított high density kultúrákban milyen intracelluláris változások zajlanak, ha hidrogén-peroxiddal kiváltott oxidatív stressz éri a differenciálódó sejteket. A hidrogén-peroxid csökkenti a porcképződést, ami nem a hidrogén-peroxid citotoxikus hatására vezethető vissza. A porcképződés mértékét részben metakromáziás festéssel, részben a porcmátrixra jellemző proteoglikán, az aggregán core fehérjének mRNS szintű expressziós változásainak RT-PCR módszerrel való vizsgálatával követtük nyomon. A különböző kísérleti csoportokban lévő kultúrák sejtjeinek homogenizátumaiban mértük a protein foszfatázok (PP1, PP2A és PP2B - kalcineurin) enzimaktivitását. A PP1 aktivitása jelentősen fokozódott, a PP2A aktivitása nem változott szignifikánsan, míg a PP2B aktivitása jelentősen csökkent a hidrogén-peroxid kezelések nyomán. A PP2B specifikus inhibitora, a ciklosporin-A (CSA) 2 μ M koncentrációban porcképződést csökkentő hatást váltott ki. A PP2B expresszióját immunoblottal és RT-PCR-rel vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a hidrogén-peroxid-kezelés mind az mRNS, mind a fehérje szinten gátolta a PP2B szintézisét. Ebből arra a következtünk, hogy a PP2B szerepet játszik a porcképződés szabályozásában és egyik mediátora lehet a hidrogén-peroxid porcképződést gátló hatásának.

Az oxidatív stressz fokozta a cAMP-dependens protein kináz (PKA), valamint az egyik PKC izoenzim, a PKC μ aktivitását és ez utóbbi enzim foszforiláltságának mértékét is. (A PKC μ -nek a porcosodó sejtekben való jelenlétét munkacsoportunk közölte elsőként: 1. közlemény.) A PKC μ porcdifferenciációban betöltött szerepét bizonyítja az is, hogy az aktivitását gátló reszveratrol erőteljesen csökkenti a porcképződést. A PKC μ többek között szerepet játszik az ERK1/2 jelátviteli út szabályozásában is. Az ERK 1/2 aktivitás fokozódásának szerepét az oxidatív stressz kondrogenezist gátló hatásában alátámasztja az

is, hogy az ERK gátlása PD098059-cel fokozta a porcképződést még az hidrogén-peroxid-kezelt kultúrákban is. Eredményeink összességében azt sugallják, hogy az oxidatív stressz különböző kináz és foszfatáz aktivitások modulálása révén az ERK1/2 foszforilációs szintjét megemelve csökkenti a porcképződést (12).

III. Protein foszfatázok, illetve defoszforilációs folyamatok szabályozása

A miozin foszfatáz (MP) holoenzim katalitikus alegységből (PP1c) és 130/133 kDa miozin kötő alegységből (MYPT1) áll. Elsődleges funkciója a miozin könnyűláncának defoszforilációja, és ezzel fontos szerepet játszik a simaizom és nem-izom sejtek kontrakciójának és motilitásának szabályozásában. A MP aktivitását a MYPT1 Thr695 és Thr850 oldalláncának Rho-asszociált kináz (ROK) általi foszforilációja szabályozza. Kimutattuk, hogy az ILK (Intergrin-Linked-Kinase) is sokoldalúan szabályozhatja a miozin foszforilációját, és az enzim részlegesen aktív formája simaizomokban és trombocitákban is előfordul, ahol kontraktilis és citoskeletális fehérjékkel asszociálódik. Az ILK által foszforilált MYPT1 gátlódik, elősegítve a magasabb miozin foszforilációs szint kialakulását. Ezen szabályozási folyamatok, a ROK hatásához hasonlóan, a kontraktilis folyamatok kifejlődését segíthetik elő alacsony intracelluláris kalciumkoncentrációknál (2).

Eredményeink szerint a MP és a MYPT1 jelen van az agyszövetben is. Az MP aktivitása és a MYPT1 mennyisége hasonló régió- és szubcelluláris megoszlást mutat, amely a MYPT1 célra irányító funkciójára utal az idegsejtekben. A MP és a MYPT1 valamennyi agyrégióban kimutatható, de koncentrációja specifikus magcsoportokhoz az idegsejtekre specifikus fiziológiai funkciókat sejtet. A MP-t kimutattuk az agykéregből izolált szinaptoszómák preszinaptikus frakciójában, és igazoltuk kölcsönhatását a szinaptofizin fehérjével, ROK-kal és a PP1cδ izoformával. A MP tehát szerepet játszhat a szinapszisok vezikuláris transzportjában és a neurotranszmitterek kibocsátásában a szinaptikus résbe (9).

A HepG2 sejtek kezelése foszfatázinhibitor okadainsavval (OA) a protein foszfatáz 2A (PP2A) enzim gátlását eredményezve szabályozza az MLC20 és a MYPT1 foszforilációs szintjét. Az OA a MYPT1 citoplazmából plazmamembránba történő transzlokációját okozta és növelte a MYPT1 foszforilációját a gátló Thr695 oldalláncon. Ezen hatásokat a ROK inhibitor Y27632 kevésbé befolyásolta. Az OA növelte a MYPT1 foszforilációját a Thr850 oldalláncon (MYPT1^{pThr850}), amelyet Y27632 nagymértékben gátolt. A MYPT1^{pThr850} a sejtmagban és a perinukleáris régióban volt jelen. Az OA kezelés a MLC20 Ser19 foszforilációját és a foszforilált miozin-II-nek a sejtek centrális részén való koncentrációját indukálta, amelyet az Y27632 részlegesen gátolt. HepG2 sejtekben az OA hatására stresszrostok képződtek és csökkent a sejtek migrációs készsége, de e változások a ROK inhibitor jelenlétében nem figyelhetők meg. Következtetésünk az, hogy az OA PP2A- és részben ROK-függő módon a MYPT1 szelektív foszforilációját és transzlokációját indukálja, ami a miozin defoszforilációjának gátlásával párosul. Ezek a hatások a miozin fenntartott foszforilációját eredményezve szabályozzák a sejtek motilis sajátságait (14).

Az elmúlt években csoportunk több glükopiranoz–hidantoin származékot állított elő. Mint azt a korábbi beszámolóinkban részletesen bemutattuk az egyik tiohidantoin származék, a D-glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin (TH), az izom és a máj glikogén foszforiláz (GF) enzimek hatékony inhibitorának bizonyult, továbbá jelentősen fokozta a GF inaktiválását, defoszforilációját. A különböző szerkezetű vegyületek kötődését tanulmányozva a GF molekulához röntgenkristallográfiás módszerrel, újabb analógokat állítottunk elő és elemeztük a kémiai szerkezet és a gátlási adatok összefüggését (10,11,15). További elismerés, hogy a pályázatunk alapját képező glükózanalóg inhibitorok lehetséges terápiás szerepéről felkérésre összefoglalót írtunk a Current Pharmaceutical Design folyóiratba [5].

Az OTKA támogatás feltüntetésével megjelent *in extenso* közlemények jegyzéke

1. R. Zákány, K. Szűcs, É. Bakó, S. Felszeghy, G. Czifra, T. Bíró, L. Módis, P. Gergely: Protein Phosphatase 2A Is Involved in the Regulation of Protein Kinase A Signalling Pathway During *In Vitro* Chondrogenesis. *Exp. Cell Res.* 275, 1-8 (2002)
IF = 4,712
2. E. Kiss, A. Murányi, C. Csontos, P. Gergely, M. Ito, D. J. Hartshorne, F. Erdődi: Integrin-linked kinase phosphorylates the myosin phosphatase target subunit at the inhibitory site in platelet cytoskeleton. *Biochem. J.* 365, 79-87 (2002) IF = 4,589
3. L. Virág, E. Szabó, E. Bakondi, P. Bai, P. Gergely, J. Hunyadi, C. Szabó: Nitric oxide-peroxynitrite-poly(ADP-ribose) polymerase pathway in the skin. *Exp. Dermatol.* 11, 189-202 (2002)
IF = 2,303
4. E. Bakondi, M. Gönczi, E. Szabó, P. Bai, P. Pacher, P. Gergely, L. Kovács, J. Hunyadi, C. Szabó, L. Csernoch, L. Virág: Role of intracellular calcium mobilization and cell density-dependent signalling in oxidative stress-induced cytotoxicity in HaCaT keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 121, 88-95 (2003)
IF = 3,746
5. L. Somsák, V. Nagy, Zs. Hadady, T. Docsa, P. Gergely: Glucose analog inhibitors of glycogen phosphorylases as potential antidiabetic agents: recent developments. *Curr. Pharm. Design* 9, 117-1189 (2003)
IF = 4,692
6. L. Virág, É. Szabó, P., Gergely, C. Szabó: Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol. Lett.* 140-141, 113-124 (2003)
IF = 2,242
7. E. Bakondi, P. Bai, K. Erdélyi, C. Szabo, P. Gergely, L. Virág: Cytoprotective effect of gallotannin in oxidatively stressed HaCaT keratinocytes: the role of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp. Dermatol.* 13, 170-178 (2004)
IF = 2,303
8. L. Virág, P. Bai, I. Bak, P. Pacher, J.G. Mabley, L. Liaudet, E. Bakondi, P. Gergely, M. Kollai, C. Szabo: Effects of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition on inflammatory cell migration in a murine model of asthma. *Med. Sci. Monit.* 10, BR77-83 (2004)
IF =
9. B. Lontay, Z. Serfőző, P. Gergely, M. Ito, D.J. Hartshorne, F. Erdődi: Localization of myosin phosphatase target subunit 1 in rat brain and in primary cultures of neuronal cells. *J. Comp. Neurol.* 478, 72-87 (2004)
IF = 3,672
10. Z. Györgydeák, Z. Hadady, N. Felföldi, A. Krakomperger, V. Nagy, M. Tóth, A. Brunyanszki, T. Docsa, P. Gergely, L. Somsák: Synthesis of N-(beta-D-glucopyranosyl)- and N-(2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranosyl) amides as inhibitors of glycogen phosphorylase. *Bioorg. Med. Chem.* 12, 4861-4870 (2004)
IF = 2,185
11. E.D. Chrysina, M.N. Kosmopoulou, C. Tiraidis, R. Kardakaris, N. Bischler, D.D. Leonidas, Z. Hadady, L. Somsák, T. Docsa, P. Gergely, N.G. Oikonomakos: Kinetic and crystallographic studies on 2-(beta-D-glucopyranosyl)-5-methyl-1, 3, 4-

oxadiazole, -benzothiazole, and -benzimidazole, inhibitors of muscle glycogen phosphorylase b. Evidence for a new binding site. *Protein Sci.* 14, 873-888 (2005)
IF = 3,787

12. R. Zákány, Z. Szíjgyártó, C. Matta, T. Juhász, C. Csontos, K. Szűcs, G. Czifra, T. Bíró, L. Módos, P. Gergely: Hydrogen peroxide inhibits formation of cartilage in chicken micromass cultures and decreases the activity of calcineurin: implication of ERK1/2 and Sox9 pathways. *Exp Cell Res.* 305,190-199 (2005) IF = 3,949
13. K. Erdélyi, A. Kiss, E. Bakondi, P. Bai, C. Szabo, P. Gergely, F. Erdődi, L. Virág: Gallotannin inhibits the expression of chemokines and inflammatory cytokines in A549 cells. *Mol. Pharmacol.* 68, 895-904 (2005) IF = 5,080
14. B. Lontay, A. Kiss, P. Gergely, D.J. Hartshorne, F. Erdődi F: Okadaic acid induces phosphorylation and translocation of myosin phosphatase target subunit 1 influencing myosin phosphorylation, stress fiber assembly and cell migration in HepG2 cells. *Cell Signal.* 17, 1265-1275 (2005) IF = 4,741
15. L. Somsák, V. Nagy, Zs. Hadady, N. Felföldi, T. Docsa, P. Gergely: Recent developments in the synthesis and evaluation of glucose analog inhibitors of glycogen phosphorylases as potential antidiabetic agents. *Frontiers in Medicinal Chemistry* 2, 253-272 (2005)